



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 國際特許分類 ³ C07H 21/04; C12N 15/00 // C12P 19/34, 21/00	A1	(11) 國際公開番号 (43) 國際公開日	WO 82/ 02715 1982年8月19日 (19. 08. 82)
(21) 國際出願番号 PCT/ JP82/ 00034			
(22) 國際出願日 1982年2月4日 (04. 02. 82)			
(31) 優先権主張番号 特願昭 56- 14373 特願昭 56- 108539			
(32) 優先日 1981年2月4日 (04. 02. 81) 1981年7月11日 (11. 07. 81)			
(33) 優先権主張国 JP			
(71) 出願人 (米国の除外をすべての指定国について)			
財団法人 癌研究会 (JURIDICAL FOUNDATION, JAPANESE FOUNDATION FOR CANCER RESEARCH) [JP/ JP]			
〒170 東京都豊島区上池袋1丁目37番1号 Tokyo, (JP)			
(72) 発明者; および			
(75) 発明者/ 出願人 (米国の除外のみ)			
菅野晴夫 (SUGANO, Haruo) [JP/ JP]			
〒167 東京都杉並区南荻窪4-8-13 Tokyo, (JP)			
谷口雄雄 (TANIGUCHI, Tadatsugu) [JP/ JP]			
〒176 東京都板橋区田柄4-27-12			
ユーパレス田柄303号 Tokyo, (JP)			
大野茂男 (ONO, Shigeo) [JP/ JP]			
〒152 東京都目黒区八雲4-4-8 Tokyo, (JP)			
(81) 指定国			
DE (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), US.			
添付公開書類 国際調査報告書			

BEST AVAILABLE COPY

(54) Title: HUMAN INTERFERON-B GENE

(54) 発明の名称 ヒトインターフェロン-β 遺伝子

(57) Abstract

Human interferon- β gene of human chromosom origin, DNA containing said gene and DNA participating in control of transcription of said gene, and recombinant DNA between said DNA and vector DNA. Said gene and DNA can be introduced into cells of eukaryote to produce human interferon- β by the cells.

[illegible]

(57) 要約

本発明はヒト染色体由来のヒトインターフェロイン- β 遺伝子、該遺伝子および該遺伝子の断片の誘導に関するDNAを含むDNA、ならびに該DNAとスクター-DNAとの起滅性DNAに関する。本発明の遺伝子ならびにDNAは真核生物の細胞に取り込ませて該細胞にヒトインターフェロイン- β を産生させることができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AT	オーストリア	LI	リヒテンシュタイン
AU	オーストラリア	LK	スリランカ
BE	ベルギー	LU	ルクセンブルグ
BR	ブラジル	MC	モナコ
CF	中央アフリカ共和国	MG	マダガスカル
CG	コンゴ	MR	モーリタニア
CH	スイス	MW	マラウイ
CX	カメルーン	NL	オランダ
DE	西ドイツ	NO	ノルウェー
DK	デンマーク	RO	ルーマニア
FI	フィンランド	SE	スウェーデン
FR	フランス	SN	セネガル
GA	ガボン	SV	ソビエト連邦
GB	イギリス	TD	チャード
HU	ハンガリー	TO	トーゴ
JP	日本	US	米国
KP	朝鮮民主主義人民共和国		

発明の名称

ヒトインターフェロン- β 遺伝子

〔技術分野〕

本発明はヒト染色体由来のヒトインターフェロン- β 遺伝子〔インターフェロン β の遺伝子の全転写領域に対応するDNA（デオキシリボ核酸）〕、該遺伝子および該遺伝子の転写の調節に関与するDNAを含むDNA、ならびに該DNAとベクターDNAとの組換え体DNAに関する。

〔従来技術〕

ヒトインターフェロン- β のcDNAをmRNAを鋳型として取り出すことは知られている〔Gene, 10, 11~15, (1980)〕。

〔発明の開示〕

本発明者らは、組換えDNA技術を用い、プラスミドDNA（たとえば大腸菌由来のプラスミドDNA）あるいはファージDNA（たとえば大腸菌由来の λ ファージDNA）にヒトインターフェロン遺伝子を挿入した組換え体DNAによるインターフェロンの大量増殖を目的に研究を行った。その結果、細菌たとえば大腸菌内で増殖、増幅させ、最終的にはヒトインターフェロン- β を細菌たとえば大腸菌に生産させるのに利用することができ、さらに真核細胞内たとえばマウス細胞の染色体遺伝子中に組込み、あるいはウィルスに組み込んで真核細胞内に取り込ませ、真核細胞たとえばマウス細胞にヒトインターフェロン- β と全く同一の化学構造を有する物質を生産させるのに利用することのできる新規な組換え体DNAを見出し、本発明を完成するに至った。

該組換え体DNAはヒトインターフェロン- β の染色体内遺伝子の少なくとも全転写領域、さらに転写の調節に関与していると考えられる領域をも含んだ部分を有する新規な組換え体DNAである。



本発明ではヒトの染色体遺伝子から直接ヒトインターフェロノーβ遺伝子ならびに該遺伝子とその転写調節に関与するDNAとを含んだDNAを取り出すことの成功を示している。

以下本発明を詳細に説明する。

本発明はヒト染色体由来のヒトインターフェロノーβ遺伝子、該遺伝子および該遺伝子の転写の調節に関与するDNAを含むDNA、ならびに該DNAとベクターDNAとの組換え体DNAに関する。

本発明の組換え体DNAは、概略次のようにして製造できる。

ヒト染色体全DNA、例えばヒト胎児肝臓から抽出した染色体DNAを制限酵素を用いて適当な長さに分断する。それをそのままもしくは適当な長さの部分のみを取出して電気泳動法などにより濃縮する。これを組換えDNA技術によってベクターDNAに挿入することによって組換えDNAを得る。この組換えDNAの中からヒトインターフェロノーβメッセンジャーRNAに相補性を示すDNA（ヒトインターフェロノーβのcDNA）を持つ組換え体DNAを放射性同位元素で標識したものを探針として、ヒトインターフェロノーβの染色体遺伝子を含む本発明の新規組換え体DNAを探索、採取することができる。

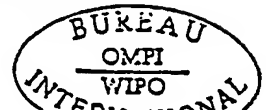
該組換え体DNAの製法についてさらに具体的に説明する。

ヒト染色体DNAを、ヒト胎児肝臓などからフェノールなどで抽出する。この抽出DNAを制限酵素、例えばHaeIIIとAluIなどで部分消化することにより適当な長さに分断する。

こうして得られるヒト染色体全DNAの断片をEcoRIリンカーなどを介してバクテリオファージT₄リガーゼなどを用いて大腸菌ファージλなどのDNAに挿入し、組換え体DNAを作る。

これをさらにパッケージング法により、より感染性の高いλファージ粒子にする。このようにして得たヒト全遺伝子を含む組換え体の集合は、ヒト遺伝子ライブラリーとよばれる。

ヒト遺伝子ライブラリーは、その構築の原理上ほとんど総てのヒ



ト遺伝子DNAを含んでおり、ほとんど総ての遺伝子をそこから単離して行くことができる。

ヒトインターフェロノン β の染色体内遺伝子の場合には、後述するように、既に遺伝子周辺の制限酵素による切断地図が明らかになっており、上述のヒト全遺伝子ライブラリーを出発点とする代りに、次のようなヒトインターフェロノン β 遺伝子について、より濃縮された組換え体の集合を出発点としてもよい。

すなわち、ヒト染色体全DNAを制限酵素HindIIIなどで完全に消化し、約10キロベース（以下Kbと略記する）程度のDNAをアガロース中の電気泳動法などによって分画し、これを上述のように λ ファージなどに組込むことによって、HindIII切断個所を両端に持つ約10KbのDNAのライブラリーを得ることができる。

ヒトインターフェロノン β の染色体内遺伝子はHindIIIによって生じる約10KbのDNA中に含まれている。この場合、全遺伝子ライブラリーに比べ、約10倍程度は濃縮されると考えられる。

上記ベクターとして用いた λ ファージはCharon系のファージ、プラスミド例えばpBR322、pCR1、pMB9、pSC1などに代えることもできる。

かくして得られたヒト遺伝子ライブラリーから次のようにしてヒトインターフェロノン β 遺伝子を含むDNA断片を持った組換え体DNAを探し出すことができる。

ヒトインターフェロノン β メッセンジャーRNAに相補的な構造(cDNA)をもった組換え体プラスミドを大腸菌 \times 1776/TpIF319-13 ATCC31712 からCurrierとNesterの方法〔Analyt.Biochem.Vol. 76, 431-441 (1976)〕によって取出す。これをニックトランスレーション法〔Roopら, Cell 15, 671~685 (1978)〕に従って〔 32 P〕で標識し、これを探針とする。

一方、大腸菌ファージをベクターとして用いた上述の遺伝子ライブラリーを寒天平板上に展開し、各々のクローンに対応するファージ



ジブラーク中のDNAをBentonnとDavisの方法〔Science, 196, 180-182 (1977)〕に従ってフィルター上に固定する。

このフィルターに対して上記探針を用いてハイブリダイゼーションを行い、ラジオオートグラフィーにより、ヒトインターフェロンの β メッセンジャーRNAに相補的な構造をもった組換え体に会合するDNAを持ったファージのクローンを判別する。

かくして得たファージを増巾し、DNAを抽出する。該DNAをEcoRIなどの制限酵素で消化し、アガロースゲル電気泳動で分画する。得られる画分をSouthernの方法〔J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975)〕でフィルターに固定する。上記の探針を用いてハイブリダイゼーションを行い、いわゆるSouthernブロッティング分析(同上文献)する。このようにしてcDNAにハイブリダイズする、例えば1.8KbのEcoRI断片をもつファージクローンを得る。

このファージクローンから、例えばSmithとBirnstielらの方法〔Nucleic Acids Res. 3, 2387-2398 (1976)〕により、より詳細な制限酵素地図を作成する。

さらに、例えばMaxamとGilbertらの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560-564, (1977)〕によりDNAの塩基配列を決定する。このDNAの塩基配列をヒトインターフェロンのcDNA〔Gene 10, 11-15 (1980)〕の塩基配列と比較すると、得られたクローンはヒトインターフェロンの β メッセンジャーRNAに対応する染色体内遺伝子、すなわちヒトインターフェロンの β の染色体内遺伝子を含むことが同定できる。

このヒトインターフェロンの β 遺伝子ならびに該遺伝子とその転写の調節に関与するDNAを含むDNAは上記で得られた組換え体DNAの中からBentonとDavisの方法〔Science, 196, 180-182 (1977)〕やGrunstein-Hognessの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961-3965 (1975)〕に従って採取する。



〔図面の簡単な説明〕

第1図aは、 λ HIFN- β 1-121 にクローン化された1.5 Kb染色体DNA切片の制限酵素地図を示す。図中断続線はCharon 4AからのベクターDNAの腕を示す。

第1図bおよびdは、ヒト染色体DNAに由来する1.8KbのEcoRI断片の制限酵素地図を示す。図中黒い帯はメッセージーRNAがそこから転写されることを示す。

第1図cは、ヒト染色体DNA中のインターフェロン- β cDNAに対応する部分を示す。図中白枠は蛋白コーディング領域を示す。

第1図eは、配列決定の始点と方向を示す。図中矢印は分析した各画分の配列の方向および広がりをしめす。

第1図中の記号は、下記文献に記載された制限酵素を示す。

EcoRI : Methods Mol.Biol. 7, 87 (1974)

Bgl II : Nucleic Acids Res., 3, 1747 (1976)

HindIII : J.Mol. Biol., 92, 331 (1975)

BamHI : J.Mol.Biol., 97, 123 (1975)

Pst I : Nucleic Acids Res., 3, 343 (1976)

Pvu II : Gene 8, 329-343 (1980)

HinfI : J.Mol.Biol., 110, 297 (1977)

Alu I : J.Mol.Biol., 102, 157 (1976)

Hae III : J.Virol., 10, 42 (1972)

Taq I : Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 74, 542 (1977)

Ava II : Biochem.J., 159, 317 (1976)

Hin II : Gene 8, 329-343 (1980)

EcoRII : Nature New Biol., 244, 7 (1973)

第2図は、1.8 Kb EcoRI断片の塩基配列を示す。図中+1 ~ +561はヒトインターフェロン- β の蛋白質をコードする部分を示し、-73 ~ -75の矢印は転写開始部位を示し、下線はTATAボックスを示す。



〔発明を実施するための最良の形態〕

以下に本発明の態様を実施例によって説明する。

実施例 1.

ヒト遺伝子ライブラリーはTom Maniatis (California Institute of Technology) から供与を受けたが、これは次のようにして作られたものである。

ヒト胎児肝臓から染色体全DNAをフェノールなどで抽出し、制限酵素 HaeIII と AluI で部分消化する。こうして得られた DNA 断片の中から鎖長が 18 - 25 K b 程度のフラグメントをショ糖密度勾配遠心法により濃縮し、次に制限酵素 EcoRI の切断箇所を持つ短鎖合成ヌクレオチドを介して大腸菌ファージ λ Charon 4 A のアーム DNA に接続し、感染性のあるファージ DNA 組換え体を作成する。次に、さらに感染性を高める目的でパッケージング法により完全なファージ λ 粒子にしてある。このようにして作られたヒト遺伝子ライブラリーは原理的にはほとんどすべてのヒト遺伝子を含む鎖長 18 - 25 K b のヒト DNA を含んだ組換え体の集合であると考えられる。

ヒト遺伝子ライブラリーからヒトインターフェロナー β の遺伝子を含む DNA 断片を持つ組換え体ファージはヒトインターフェロナー β の cDNA の蛋白に翻訳される部分すべてを持つ cDNA 断片を (32 P) で放射標識したものを探針として Benton と Davis の方法 [Science 196, 180-182 (1977)] により探索した。以下にその詳細を述べる。

先ず、探針として用いるヒトインターフェロナー β の cDNA の蛋白に翻訳される部分すべてを持つ約 0.57 K b の DNA 断片は次の様にして調製し、放射標識した。

ヒトインターフェロナー β の cDNA を含む組換え体プラスミド pIF 319-13 を持つ大腸菌 λ 1776 / pIF 319-13 ATCC 31712 から Currier と Nester らの方法 [Analyt. Biochem. 76, 431-441]



(1976)) によってTpIF 319-13プラスミドDNAを精製し、制限酵素HincII, Bgl II, Hha Iで消化する。得られた消化物中、最も鎖長の長い0.57KbのDNA断片が目的とするDNA断片であるが、これをTabakとFlavellの方法(Nucleic Acids Research 5, 2321-2332 (1978)) によりアガロース電気泳動法で他の断片と分離し精製する。これをニックトランスレーション法(たとえばRoopら, Cell 15, 671-685 (1978)) により(32 P)で放射標識する。すなわちDNA (0.5 μ g) を50mM Tris-HCl (pH7.8) 5mM MgCl₂, 10mM β -メルカプトエタノール, 5 μ M dGTP, 150 μ M dTTP, 1ng DNase I (Worthington 社製), (32 P)- α -dCTP (100 μ Ci, 2000-3000Ci/mmol, RCC Amersham社製), 15 unit DNA polymerase I (Boehringer Mannheim 社製) を含む30 μ lの水溶液中で15 $^{\circ}$ C, 4時間インキュベートした。ついでEDTAを添加し終濃度20mMとし, 65 $^{\circ}$ C, 10分間インキュベートし酵素を失活させる。次にフェノールで除蛋白した後, Sephadex G-50 (Pharmacia Fine Chemical 社製) カラムクロマトグラフィーで脱塩し, 探針に供する。このようにして得られた(32 P)で放射標識されたcDNA断片は10⁸ cpm/ μ g程度の放射活性を持つ。

以上述べた方法により, ヒトインターフェロナー β cDNAの断片を放射標識して調製したDNA断片を探針としてヒト遺伝子ライブラリーからヒトインターフェロン遺伝子を含むDNA断片を持つ組換え体ファージを次のようにして探索する。

まず, 寒天プレート[Science 202, 1279-1284 (1978)] 上に先のファージ粒子をまきファージブランクを形成させる。このブランクの密度は直径15cmのプレート1枚あたり1万~3万個程度にする。次にこの寒天プレート上にニトロセルロース紙

(SchleicherとSchull社販売) を重層し, 方向づけのためにマークをつけ, 4 $^{\circ}$ Cで約20分間放置し, ファージを吸着させる。ブ



レートは4℃に保存しておき、ニトロセルロース紙を室温で約90分間風乾する。これを0.1 N NaOH, 1.5 M NaClの水溶液中に約20秒間浸し、ファージDNAを変性させる。次に0.2 M Tris-HCl (PH 7.4), 2×SSC (SSCとは0.15 M NaCl, 0.015 M クエン酸ソーダを含む水溶液を言う。2×SSCとはその2倍の濃度のものを言う。)中で約20秒間中和し、さらに2×SSC中で20秒間処理する。室温で1時間風乾後、80℃で3時間風乾し、変性したファージDNAをニトロセルロース紙上に固定する。

このようにして作成したニトロセルロース紙上のファージDNAに対し、先に述べたようにして放射標識されたヒトインターフェロナーβcDNAを探針としてハイブリダイゼーションを次のように行った。

ニトロセルロース紙を3×SSC中で65℃, 30分間処理し、3×SSCに0.2%ポリビニルピロリドン(半井化学社製), 0.2%ウシ血清アルブミン(岩井化学社製), 0.2%フィコール(Pharmacia Fine Chemical社製)を加えた溶液中で65℃, 60分間処理する。さらに1 M NaCl, 50mM Tris-HCl (PH 8.0), 10 mM EDTA, 0.1% SDS, 100 μg/mlの超音波処理し、熱変性した大腸菌DNAを含む溶液(ハイブリダイゼーション溶液)中で65℃, 60分間の処理をすることによりハイブリダイゼーションのための全処理とする。

一方、放射標識された探針のDNAを95℃, 10分間の処理をすることにより熱変性させておく。次に、前処理したニトロセルロース紙と、この熱変性した探針のDNAとを上記ハイブリダイゼーション溶液中、65℃でインキュベートし、ハイブリダイゼーションを行う。12-18時間後、ニトロセルロース紙を取り出し、まず2×SSCで2回洗い、0.3×SSC, 0.1% SDSを含む溶液中で65℃, 60分間の処理を2回行い、最後に80



で1時間風乾させ、X線フィルムを用いてラジオオートグラフィーを行う。

4℃に保存しておいた寒天板と、ラジオオートグラムとを重ねあわせることにより探針と会合した部分のフェージをかき取り、さらに上記の操作を繰返し行うことにより、インターフェロノーβ c DNAに会合するDNAを持つ組換え体フェージを単一クローンにまで精製する。

このようにして、約100万個のフェージブランクをスクリーニングすることにより11個のクローンを得た。

次に各クローンの組換え体DNAをManiatisの方法〔Cell, 15, 687-701 (1978)〕により調製し、以下の解析に用いた。

まず、各クローンの組換え体DNAを制限酵素EcoRIで切断し、アガロースゲル電気泳動により生じたDNA断片の鎖長を測定する。すべてのクローンのDNAの消化物はベクターであるフェージλ Charon 4 Aのアームに由来する20 Kb, 11 KbのDNA断片を持つが、それ以外にヒト染色体内DNAに由来するいくつかのDNA断片を持つ。この解析により11個のクローンは5種類に分類された。さらに上述のスクリーニングのときに用いたヒトインターフェロノーβ c DNAを探針としてサザンハイブリダイゼーション〔Southern, J.Mol.Biol, 98, 503-517 (1975)〕を行なうことにより、たとえばEcoRI消化により得られたどの長さのDNA断片がヒトインターフェロノーβ c DNAに会合するかということが同定された。

すなわち各フェージクローンのDNAをEcoRIで消化し、アガロースゲル電気泳動を行う。泳動後ゲルを切り出し、0.5 N NaOH, 1 M NaClを含む水溶液中、室温で30分間処理することによりDNAを変性する。さらに0.5 N Tris-HCl (PH 7.0), 1.5 M NaClを含む水溶液中で同様の処理を2回くり返し行い、ゲルを中和する。ゲルを20×SSCをしみ込ませた濾紙上に置き、ゲルの上



にニトロセルロース紙を置き、さらにその上に濾紙、紙タオルの順に重層し、ゲル中の変性したDNAをニトロセルロース紙に吸着させる。12-18時間後ニトロセルロース紙をゲルからはがし、80℃で3時間風乾することにより、DNAをニトロセルロース紙上に固定する。以下は上述したファージのスクリーニングに際して行ったと全く同様にしてハイブリダイゼーションを行なう。

このようにしてクローン化された5種類のヒト染色体遺伝子断片のうち4種類が1.8 KbのEcoRIによって生ずるDNA断片（以下EcoRI断片という）を含み、この1.8 KbのEcoRI断片がヒトインターフェロンc DNAと相補的な構造を持っていることが明らかになった。他の1種類のクローンについては、この1.8 KbのEcoRI断片の途中から始まるDNA断片を含んでいることが明らかになった。

11個のクローンのうち1.8 KbのEcoRI断片を生ずるものの1つである λ HIFN- β , -121と名づけられたクローンについては、さらにHindIII, BamHI, BglII, Pst Iなどの制限酵素を用いて同様の実験を行うことにより、制限酵素による切断地図を作成した。これを第1図aに示す。

次にヒトインターフェロン- β c DNAに相補性を示す1.8 KbのEcoRI断片について詳細に検討を加える目的で、この1.8 KbのEcoRI断片をプラスミドpBR322をベクターとして再びクローン化した。この方法を以下に示す。

λ HIFN- β , -121 DNA 1 μ gを制限酵素EcoRIで消化した後、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (PH 6.9), 6mM $MgCl_2$, 6 mMメルカプトエタノール, 1 mM ATP, 1 mM TTPを含む30 μ lの水溶液中で5ユニットのDNAポリメラーゼクレノーフラグメント (Boehringer Mannheim 社製) を用いて、EcoRI切断箇所を修復する。フェノールで除蛋白した後、ターミナルトランスフェラー

ぜを $30 \mu\text{g}$ の反応液 (DNA $1 \mu\text{g}$: カコジル酸カリ (PH7.6) 0.14M ; トリス 0.03M ; ジチオスレイトール 0.1mM ; CaCl_2 1mM ; dCTP 1mM ; 2 ユニットのターミナルトランスフェラーゼ) 中で 37°C , 15 分間反応させ, 各 EcoRI 断片の $3'$ 両端に約 100 個のデオキシシチジン鎖を延長させる。一方 pBR322 を Pst I で切断し, 同様にして Pst I 切断箇所の $3'$ 両端に約 100 個のデオキシグアニン鎖を延長して作ったベクターを準備しておく。このようにして得られたヒト染色体遺伝子 DNA の EcoRI 切断片 $0.05 \mu\text{g}$ と pBR322 DNA $0.05 \mu\text{g}$ とを 0.1M NaCl, 50mM Tris-HCl (PH 7.5), 5mM EDTA よりなる溶液中で 65°C , 2 分間, 45°C , 1 時間, 37°C , 1 時間, 室温, 1 時間インキュベートして会合させる。これに Enea らの方法 [J. Mol. Biol. 96, 495-509 (1975)] に従って大腸菌 $\times 1776$ を形質転換させる。得られたテトラサイクリン耐性株の中から, 400 個の耐性株を選び各々の DNA をニトロセルロース紙上に固定する (Grunstein-Hogness 法, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961-3965 (1975))。このニトロセルロース紙上で上記ファージのスクリーニングあるいはサザンハイブリダイゼーションのときに行なったのと同様の方法 (ハイブリダイゼーション溶液中に熱アルカリ処理して断片化し, さらに熱変性した pBR322 DNA を $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で加えた。) で, 同じ探針 (インターフェロナー β cDNA) を用いてハイブリダイゼーションを行い, 1.8 Kb の EcoRI 断片を持つ組換え体プラスミドをもつ大腸菌株を同定した。

このようにして得た大腸菌からヒトインターフェロナー β cDNA に会合する組換え体 DNA を含む 1.8 Kb の EcoRI 断片を持つ組換え体プラスミド DNA を前記 Currier と Hester の方法で調製し, 以下の解析に供した。

このヒト染色体 DNA に由来する 1.8 Kb の EcoRI 断片がヒトインターフェロナー β のメッセンジャー RNA に相補的な DNA



を含んでいることは、以上で明らかであるが、そのことをさらにはっきりさせる目的で、制限酵素による切断地図を、組換え体プラスミドのDNAあるいはその一部を1種類あるいは2種類以上の制限酵素で切断する方法により、または3'末端をポリヌクレオキナーゼを用いて(^{32}P)で標識した断片を制限酵素で部分消化する方法〔SmithとBirnstiel, *Nucleic Acids Res.*, 3, 2387-2398 (1976)〕により生じたDNA断片の鎖長をアガロース電気泳動などにより測定することにより作成した。(第1図 b,d) 第1図 c にインターフェロナー β cDNAの対応する部分を示したが(白枠は蛋白コーディング領域を示す), cDNAと全く同一の制限酵素切断地図を示す部分があることが発見された。

以上の事実から、ここで得られたヒト染色体DNA由来の 1.8Kb EcoRI DNA断片上に、ヒトインターフェロナー β メッセンジャーRNA(すなわちcDNA)と全く同一の配列のあること、すなわちこの 1.8 Kb EcoRI DNA断片がヒトインターフェロナー β の染色体内遺伝子(第1図 b の黒い帯)を含んでいることが明らかになった。

さらに他の多くの真核細胞の遺伝子中に存在するインターフェロニングシーケンス(介在配列)がヒトインターフェロナー β の遺伝子に関して存在しないことが明らかになった。得られた 1.8

Kb EcoRI断片中に含まれているインターフェロナー β 遺伝子が介在配列を持っていないということは、この遺伝子DNAを用いて、介在配列を切り出すメカニズムのない、例えば大腸菌などの原核生物にインターフェロナー蛋白を合成させることが可能であることを示している。

上記のことを決定的に証明する目的で、この 1.8 Kb EcoRI断片の塩基配列をMaxamとGilbertの方法〔*Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 74, 560-564 (1977)〕により決定した。その結果を第2図に示す。



この 1.8 Kb EcoRI 断片は大腸菌に挿入し、米国アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに Escherichia coli CI 4 ATCC 31905 として寄託されている。



請 求 の 範 囲

- (1) ヒト染色体由来のヒトインターフェロナー β 遺伝子。
- (2) ヒト染色体由来のヒトインターフェロナー β 遺伝子および該遺伝子の転写の調節に関与するDNAを含むDNA。
- (3) ヒト染色体由来のヒトインターフェロナー β 遺伝子および該遺伝子の転写の調節に関与するDNAを含むDNAとベクターDNAとの組換え体DNA。
- (4) 該ベクターDNAが大腸菌由来の λ ファージ, Charon系ファージ, プラスミド pBR 322, pCR 1, pMB 9 および pSC 1 から選ばれた特許請求の範囲第3項記載の組換え体DNA。

$\frac{1}{2}$ 

2/2

第 2 図

GAATTCTCAGCTCGTTTGGTTTCTTTGCTTTCTCCCAAGTCTTCTTTACAAATTTC
-350

CTTACTCATTCACTGAAACTTTAAAAACATTAGAAAACTCAGTTTCTAAATCTTTTCCCTATTATATATATATACATAGCATAGCATCTTAAATAAA
-300

GAGTTTACAACTACTAAATCTAAATGACATAGGAAACTGAAAGGGGAGAGTGAAGTGGGAAATTCCTCTGAATAGACAGAGGACCATCTCATATA
-200

AATAGGCCATACCCACGGAGAAAGCACTTCTAACTCCAACCTTTCCAGCTTTCTCTGGCACAACAGGTAGTACGGCCACACTGTTCTGTTGTCAAC
-100

Met thr asn lys cys leu leu gln ile ala leu leu leu cys phe ser thr thr ala leu ser MET SER TYR ASN
ATG ACC AAC AAG TGT CTC CTC CAA ATT GCT CTC CTG TTG TGC TTC TCC AGT ACA GCT CTT TCC ATG ACC TAC AAC
+1 50

LEU LEU GLY PHE LEU GLN ARG SER SER ASN PHE GLN CYS GLN LYS LEU LEU TRP GLN LEU ASN GLY ARG LEU GLU
TTG CTT GGA TTC CTA CAA AGA ACC AAT TTT CAG TGT CAG AAG CTC CTG TCG CAA TTC AAT CGC AGG CTT CAA
100 130

TYR CYS LEU LYS ASP ARG MET ASN PHE ASP ILE PRO GLU GLN ILE LYS GLN LEU GLN GLN PHE GLN LYS GLU ASP
TAC TGC CTC AAG GAC AGG ATG AAC TTT GAC ATC CCT GAG GAG ATT AAG CAG CTG CAG CAG TTC CAG AAG GAG GAC
200

ALA ALA LEU THR ILE TYR GLU MET LEU GLN ASN ILE PHE ALA ILE PHE ARG GLN ASP SER SER SEP THR GLY TRP
GCC GCA TTG ACC ATC TAT GAG ATG CTC CAG AAC ATC TTT GCT ATT TTC AGA CAA GAT TCA TCT ACC ACT GCC TGG
250 300

ASN GLU THR ILE VAL GLU ASN LEU LEU ALA ASN VAL TYR HIS GLN ILE ASN HIS LEU LYS THR TAL LEU GLU GLU
AAT CAG ACT ATT CTT GAG AAC CTC CTG GCT AAT GTC TAT CAT CAG ATA AAC CAT CTG AAG ACA GTC CTG CAA CAA
350

LYS LEU GLU LYS GLU ASP PHE THR ARG GLY LYS LEU MET SER SER LEU HIS LEU LYS ARG TYR TYR GLY ARG ILE
AAA CTG GAG AAA GAA GAT TTC ACC AGG GGA AAA CTC ATG AGC AGT CTG CAC CTG AAA AGA TAT TAT GGG AGG ATT
400 450

LEU HIS TYR LEU LYS ALA LYS GLU TYR SER HIS CYS ALA TRP THR ILE VAL ARG VAL GLU ILE LEU ARG ASN PHE
CTG CAT TAC CTG AGG GCC AAG GAG TAC AGT CAC TGT GCC TGG ACC ATA CTC AGA GTC CAA ATC CTA AGC AAC TTT
500

TYR PHE ILE ASN ARG LEU THR GLY TYR LEU ARG ASN
TAC TTC ATT AAC AGA CTT ACA GGT TAC CTC CGA AAC TGA AGATCTCCTAGCCTGTGCTCTGGGACTGGACAATTGCTTCAAGCATT
550 600

CTTCAACCAGCAGATGCTCTTTAAGTCAGTCGCTAATGTACTGCATATGAAAGGACACTAGAAGATTTTGAATTTTATTAAATATAGCTTATT
650 700

TTATTTATTTAAATTTTATTTCGAAATTAATTTTGTGCAAAAGTCAAGATGGCAGTTTAAATTCGATTTCATTATATAAACCATCCATATTA
750 800

TAAATTTCCCAAGTACCTATTAGTTCTTCTTTTAAATATACCTGCAAACTAGTATACCTTCTGCCCCCTGCCCTTAAGCAATTTAAATTCAGAAAG
850 900

CCATCATGGAATATATAAGGTAAGAGACAATAGGGGCACTGAACTTATGGGGCAATAAATATGUCATCAACTGCTGTGGCATTAAAGACAGAAAGGAA
950 1000

AGCTGGAGGGTCTGCAACTAAACCTCGGCTTCCCATTCCTCTACTCTGTCTTCCACATTCTCTCATATAAGTTAGAATTGAGCTGGCCATCAGGAAT
1050 1100

AGCCAGAGGAATATCTCAGCTTTTCTGTTCTCCCTAACTTCCCACTTATTTCGGGATCACCTTGGCTCTCGAAAGATTTTAAATATTATGTCGCC
1150 1200

CCCACCATCCCTGCAAGCTTAAGGGTGACAAGTCCCACTTACTTCCATGACACTATTAAGCAGCAATCTCTTTATTCTGCTCATCATGGGACAGGCAAGA
1250 1300

TGTGTGGCTATCTTAGGGGAGCTGTGGGTCCCTGTCTGCTGGCATGGCAGGCATCAGAGGAAGAAGACCTTTTATACCTAGCCATCTGCTTACTT
1350 1400

TTCTCCCTAGTTTTTCAAAAACTAAGCCTGCTTCCAGTCCCACTGCTTCTTATACAGAAATTC
1450



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/JP82/00034

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ¹ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int. Cl. ³ C07H21/04, C12N15/00// C12P19/34, 21/00		
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Minimum Documentation Searched ⁴</div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> Classification System ¹ Classification Symbols </div> <div style="padding: 5px 0;">I P C : C07H21/04, C12N15/00, C12P19/34, 21/00</div> <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁵</div>		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ^{1,6}		
Category ⁷	Citation of Document, ¹⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸
A	Nature, Vol. 285, No. 19 (June, 1980) P542 - 549. Especially see 547-549	1 - 4
E	JP,A, 57-24400 (G.D. Searle and Co.) 8. February, 1982 (08.02.82), Column 38, lines 6 to 20, column 55, line 17 to column 57, line 11	1 - 4
P	Ishikawa Kunihiro Henshu "(Bessatsu Tanpakushitsu Kakusan Koso) Interferon Kenkyu no Shinpo" 1. December, 1981 (01.12.81) Kyoritsu Shuppan Kabushiki Kaisha P169 - 182, Especially see page 174 to 175	1 - 4
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹⁹ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document cited for special reason other than those referred to in the other categories</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"P" document published prior to the international filing date but on or after the priority date claimed</p> <p>"T" later document published on or after the international filing date or priority date and not in conflict with the application, but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search ¹ April 28, 1982 (28.04.82)		Date of Mailing of this International Search Report ¹ May 10, 1982 (10.05.82)
International Searching Authority ¹ Japanese Patent Office		Signature of Authorized Officer ¹⁰

I. 発明の属する分野の分類			
国際特許分類 (IPC)			
Int. Cl. ⁸ 007H21/04, 012N15/00 // 012P19/34, 21/00,			
II. 国際調査を行った分野			
調査を行った最小限資料			
分類体系	分類記号		
IPC	007H21/04, 012N15/00, 012P19/34, 21/00		
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの			
III. 関連する技術に関する文献			
引用文献の カテゴリ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号	
A	Nature, 第285巻19号 (6月. 1980) P542-549. 特に547-549参照	1-4	
E	JP, A, 57-24400 (ジー・ディー・サール・エンド・カンパニー) 8. 2月. 1982 (080282), 第38欄第6-20行, 第55欄第17-第57欄第11行	1-4	
P	石川邦彦編集「別冊蛋白質核酸酵素」インターフェロン研究の進歩」1. 12月. 1981 (011281) 共立出版株式会社 P169-182, 特にP174-175参照。	1-4	
<p>※引用文献のカテゴリ</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」同一パテントファミリーの文献</p>			
IV. 認 証			
国際調査を完了した日		国際調査報告の発送日	
28 04 82		10.05.82	
国際調査機関		権限のある職員	
日本国特許庁 (ISA/JP)		特許庁審査官	
		4, B	6, 7, 1, 2
		小 沢 誠 次	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.